

ÜBER DEN EINFLUSS VON HARNSÄURE
AUF DIE INSULINSEKRETION ISOLIERTER
LANGERHANS 'SCHER INSELN

*Diss. Erlangen
1983*

von
GERHARD SCHUIERER
aus
FÜRTH/BAY.

1983 № 193



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik mit Poliklinik

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. L. Demling

ÜBER DEN EINFLUSS VON HARNSÄURE AUF DIE INSULINSEKRETION ISOLIERTER LANGERHANS 'SCHER INSELN

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

GERHARD SCHUIERER

aus

FÜRTH/BAY.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. W. Grabner
Korreferent: Prof. Dr. L. Demling

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.1983

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	VERSUCHSMATERIALIEN	3
2.1.	Geräte und Chemikalien	3
2.2.	Versuchstiere	5
2.3.	Puffer	5
3.	METHODEN	10
3.1.	Isolation der Langerhans'schen Inselzellen	10
3.2.	Inkubation der Langerhans'schen Inselzellen	15
3.3.	Insulinbestimmung	18
3.4.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	18
4.	VERSUCHE	20

5.2.	Inkubationsversuche	24
5.2.1.	Serie 1 (glucosefreies Medium)	24
5.2.2.	Serie 2 (100 mg/dl Glucose im Medium)	25
5.2.3.	Serie 3 (300 mg/dl Glucose im Medium)	26
5.3.	Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse	27
6.	DISKUSSION	29
6.1.	Methoden	29
6.1.1.	Isolationsmethode	29
6.1.2.	Inkubationsmethode	34
6.2.	Harnsäure und Insulinsekretion	37
7.	ZUSAMMENFASSUNG	43
8.	LITERATURVERZEICHNIS	45
	Lebenslauf	62

1. EINLEITUNG

Beim Studium der Insulinsekretion haben sich die Methylxanthine Coffein, Theophyllin, Aminophyllin und 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin in zahlreichen in vitro-Versuchsmodellen als potente Stimulatoren der Insulinsekretion erwiesen (1, 4, 7, 9, 22, 34, 37, 40, 42, 53).

Demgegenüber sind von der strukturverwandten Harnsäure (Abb. 1), dem Endprodukt des Purinstoffwechsels beim Menschen, bislang keine insulinfreisetzenden Eigenschaften bekannt. Alloxan, das ähnliche Strukturmerkmale wie die Harnsäure (Abb. 1) aufweist, wirkt in niedriger Dosierung hemmend auf die Insulinsekretion (57, 63), in höherer Dosierung zytotoxisch (17).

Daher sollte anhand der nachfolgenden Untersuchungen geprüft werden, ob Harnsäure die Insulinsekretion der B-Zellen isolierter Langerhans'scher Inseln beeinflussen kann.



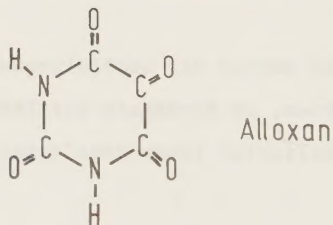
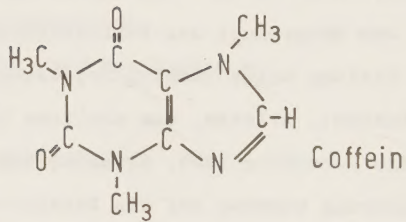
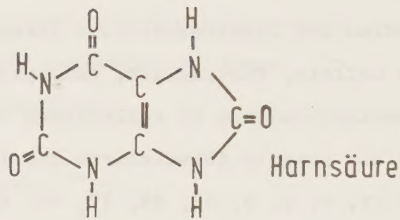


Abb. 1: Strukturformeln von Harnsäure, Coffein und Alloxan

2. VERSUCHSMATERIALIEN

2.1. Geräte und Chemikalien

Für die Versuche wurden folgende Geräte und Materialien benötigt:

1 Wasserbad (thermostatgesteuert) mit Schüttelwanne und Kunststoffeinsätzen für die verwendeten Inkubationsgefäße, Fa. GFL - Typ 1.083

1 Stereomikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar, 63-fache Vergrößerung

Dickwandige Petrischälchen, ca. 6 cm Ø

Kristallisierschälchen, Jenaer Glas, ca. 4 cm Ø mit hohem Rand und ebenem Boden

Szintillationsgläschen (25 ml) mit Schraubverschluß

Erlenmeyerkolben

Meßzylinder verschiedener Volumina

Kunststoffröhrchen (2 ml, 3 ml) mit passenden perforierten Stopfen

10 μ l-Micro-Pipetten (Fa. Brand) mit einem Kapillardurchmesser von ca. 20 - 25 μ m.

1 Operationstisch für Ratten

Anatomische und chirurgische Pinzetten, Scheren und Klemmen

1 Metallsieb, 1 pH-Meßgerät, 1 Magnetrührer und
1 Stoppuhr

6 gläserne Gasverteiler mit je 8 Anschlüssen

1 Gaswaschflasche

Rinder Serum-Albumin ROHD 20/21, Behringwerke Marburg

Harnsäure 99 % rein, MG 168, 1, Fa. Henning, Berlin

Collagenase, Best.Nr. 17499, Fa. Serva, Heidelberg
(Aktivität zwischen 360 und 650 U/mg).

Carbogengas (95 % O_2 , 5 % CO_2)

IDW Radioimmunoassay mit Ratteninsulin (Fa. De Novo)
als Standard.

2.2. Versuchstiere

Für die Sekretionsstudien an Langerhans'schen Inseln wurden die Bauchspeicheldrüsen männlicher SPF-Wistar-Ratten verwendet. Die Versuchstiere (Fa. Mus Rattus, Brunnthal) mit einem Gewicht von ca. 250 g hatten bis zu Beginn der Experimente freien Zugang zu Wasser und Standard-Trockenfutter (Fa. Altromin), da von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnte, daß durch vorausgegangenen Nahrungsentzug die normale Insulinsekretion nachhaltig gestört wird (8, 20, 39).

2.3. Puffer

Für alle Versuche wurde Gey'sche Lösung in folgender Zusammensetzung eingesetzt (19):

NaCl 7,00 g - KCl 0,370 g - CaCl_2 0,170 g - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,070 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,210 g - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,150 g - KH_2PO_4 0,030 g - NaHCO_3 2,27 g - Glucose 0,500 g auf 1.000 ml Aqua dest.

Der pH-Wert des Puffers stellt sich unter Carbogengas auf 7,40 ein. In der beschriebenen Zusammensetzung wurde die Gey'sche Lösung als Medium für die Isolation der Langerhans'schen Inseln verwendet (GLA). Für die verschiedenen Inkubationsansätze wurde der Gey'sche Puffer ohne Glucose (GL0) und mit Glucose in Konzentrationen von 100 mg/dl (GL1) und 300 mg/dl (GL3) unter Zusatz von 0,5 mg/dl Rinderserum-Albumin eingesetzt. Der Ausgleich der durch die verschiedenen Glucosekonzentrationen hervorgerufenen Änderungen der Osmolarität erfolgte durch entsprechende Korrektur der NaCl-Konzentrationen. Zur Vereinfachung des Versuchsablaufes wurden in jeweils 1.000 ml Aqua dest. folgende zehnfach konzentrierte Stammlösungen angesetzt und bei 4° C aufbewahrt:

I. KCl 3,700 g - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,700 g - $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2,100 g - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,500 g - KH_2PO_4 0,300 g

II. CaCl_2 1,700 g

III. NaHCO_3 22,700 g

GLA: Glucose 5 g - NaCl 70,00 g

GL0: Glucose 0 g - NaCl 70,80 g

GL1: Glucose 10 g - NaCl 69,20 g

GL3: Glucose 30 g - NaCl 66,00 g

Für jeden Versuch wurden folgende Puffer angesetzt
und unter Carbogengas aufbewahrt:

250 ml GLA als Arbeitspuffer

10 ml GL3 als Vorinkubationsmedium

100 ml Gey'sche Lösung mit der jeweiligen
Glucosekonzentration als Inkubations-
puffer

Für die Aufrechterhaltung des pH-Wertes und für die
Sicherstellung einer ausreichenden Sauerstoffversor-
gung der Zellen war es erforderlich, alle Puffer und
Inkubationsansätze ständig mit Carbogengas anzurei-
chern. Hierzu wurde die in Abb. 2 schematisch darge-
stellte Anlage benutzt.

Das aus der Druckflasche entnommene Carbogen wurde den verschiedenen Systemen über eine Gaswaschflasche und absperrbare Zuführungen zugeleitet. System A diente der Einstellung des pH-Wertes und der Aufbewahrung der verschiedenen Medien unter Carbogen, System B zur Begasung der Vorinkubation und das aus 6 abschließbaren Gasverteilern bestehende System C der Begasung von maximal 48 Inkubationsansätzen während der Hauptinkubation.

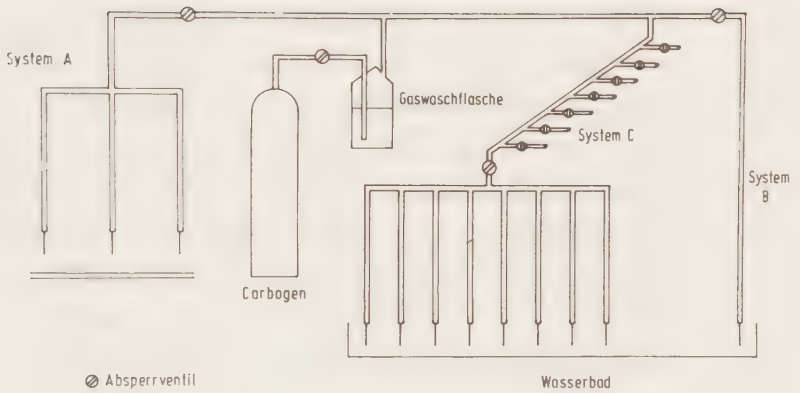


Abb. 2: Schematische Darstellung der Begasungsanlage

3. METHODEN

3.1. Isolation der Langerhans'schen Inselzellen

Die für jeden Versuch erforderlichen Materialien und Instrumente (s.S. 3 - 4) wurden bereitgestellt, Pufferlösungen unter Carbogen bei Zimmertemperatur aufbewahrt und das Wasserbad auf 37° C erhitzt.

Die mit Aether getötete Ratte wurde zunächst gewogen und anschließend in Rückenlage aufgelegt. Durch einen Median- und zwei Transversalschnitte am unteren Rippenbogen wurden 4 Hautlappen gebildet, die sich nach Abpräparieren von der Bauchdecke zur Seite hin wegklappen ließen. In gleicher Weise erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle. Hierbei mußte zur Verhinderung von Blutungen in das Präparationsgebiet sorgfältig vermieden werden, Leber und größere Gefäße zu verletzen. Bei der Präparation störende Darmschlingen wurden nach rechts unten verlagert, anschließend konnte das Duodenum mit einer Pinzette angehoben, der Ductus pancreaticus communis papillennah mit einer kleinen Klemme abgeklemmt und da-

nach das Duodenum wieder in seine Ausgangsposition zurückverlagert werden. Nach Hochdrängen des vorderen Leberlappens war es möglich, den Ductus choledochus am Leberhilus mit einer feinen Pinzette aufzunehmen und abzuklemmen. Unmittelbar distal der Pinzette wurden eine Kanüle (Nr. 18) in den Gallengang eingeführt und ca. 10 ml GLA appliziert. Hierdurch konnte das Pankreas zumeist in seiner gesamten Ausdehnung aufgebläht werden. Nach Entfernung der Kanüle und der an der Papille angelegten Klemme wurde das Pankreas an der Cauda beginnend von Milz, Magen, Duodenum und Colon transversum abgetrennt, mit einer Pinzette gefaßt und nach Durchtrennung des Ductus choledochus dem Situs entnommen.

In einem Petrischälchen wurde das Organ mit GLA gewaschen und auf dem Puffer schwimmendes Fettgewebe entfernt. Mitunter mußten noch kleine, fast ausschließlich caudal liegende Organabschnitte durch direkte Injektion von GLA in das mit einer Pinzette fixierte Pankreasgewebe aufgebläht werden (32). Nach Abgießen überschüssigen Puffers wurde das

Pankreas mit einer Schere solange zerkleinert, bis es aus kleinsten Partikeln bestand, die sich in einer 10 ml-Kunststoffspritze mit Rekordansatz aufziehen ließen. Während des Zerkleinerns und danach wurde noch mehrmals mit jeweils 10 ml-Puffer gespült und der Überstand zusammen mit Fettgewebsanteilen abgegossen.

Das so erhaltene Gewebehomogenat (ca. 1,5 - 2 ml) wurde in die Kunststoffspritze aufgezogen, mit GLA bis zur 10 ml-Marke ergänzt und in ein Gläschen mit Collagenase ausgespritzt. Die für die Inkubation eingesetzte Konzentration der Collagenase betrug ca. 360 U/ml. Mit Beginn der Collagenaseverdauung wurde eine Stoppuhr gestartet und das Homogenat im Wasserbad bei 37⁰ C mit maximaler Schüttelfrequenz (270 Hz) solange inkubiert, bis die Suspension ein milchig-trübes Aussehen angenommen hatte und nur noch feine Organpartikel zu erkennen waren.

Das Gewebehomogenat wurde mit einer Spritze aufgenommen und durch ein Metallsieb, das gröbere Gewebestücke, Gefäß- und Gangabschnitte zurückhielt, in einen im Eisbad stehenden 25 ml-Meßzylinder gespült,

der dann bis zum Oberrand mit GLA aufgefüllt wurde. Nach 5, 8 und 11 Minuten wurde der Puffer vorsichtig durch frische GLA ersetzt (ca. 30 ml) und nach weiteren 3 Minuten erneut bis zur 5 ml-Marke abgezogen. Nach anschließender Zugabe von ca. 5 ml Puffer konnten die Inseln aussortiert werden.

Zunächst wurde ein Kristallisierschälchen mit ca. 1 ml GLA auf Eis gestellt. In ein zweites Schälchen wurden 2,5 ml der aus dem Meßzylinder entnommenen Suspension und die gleiche Menge GLA aufgenommen, danach bei 63-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop systematisch nach Inseln abgesucht, die sich leicht an ihrer hellgelben Farbe, ihrer gleichmäßigen Form und ihrer Größe von den kleineren, unregelmäßig konfigurierten grau-grünen Teilen des exokrinen Gewebes unterscheiden ließen (Abb. 3). Die gefundenen Inseln wurden vorsichtig mit der Mikropipette aufgenommen und in das auf Eis stehende Sammelschälchen übertragen. Auf diese Weise wurde der gesamte Inhalt des Meßzylinders aufgearbeitet. Da es sich beim Umpipettieren nicht vermeiden ließ, daß auch geringe Mengen exokrinen Gewebes übertragen wurden, war es erforderlich, den Inhalt

des Sammelstückchen noch zweimal in der gleichen Weise auszusortieren und in vorbereitete Kristallisierschälchen zu übertragen.

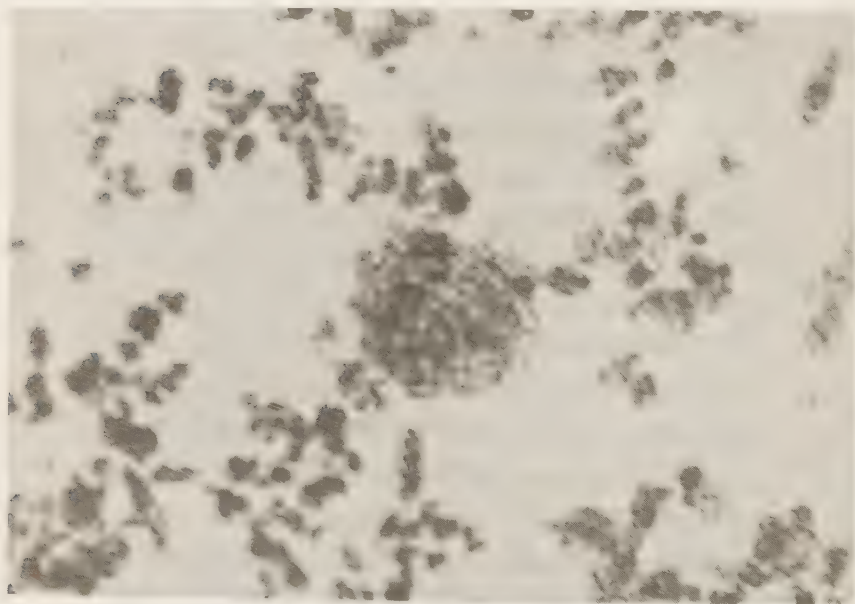


Abb. 5: Langerhans'sche Inseln mit Anteilen exokrinen Gewebes

Vergrößerung: x 600

3.2. Inkubation der Langerhans'schen Inselzellen

Die isolierten Inseln wurden in ein mit 1,5 ml GL3 gefülltes 3 ml-Kunststoffröhrchen übertragen und 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad unter Carbogenbegasung und einer Schüttelfrequenz von ca. 100 Hz inkubiert. Am Ende der Vorinkubation wurde das Röhrchen mit den Inseln für 3 Minuten auf Eis gestellt, der Puffer dann vorsichtig abgezogen und durch frische, eiskalte GLA ersetzt. Dieses Vorgehen wurde nach 3 und 6 Minuten wiederholt. Anschließend konnten die am Boden des Kunststoffröhrchen liegenden Inseln in ein Kristallisierschälchen gespült werden. Die Zeit zwischen jedem Pufferwechsel wurde genutzt, um durchnummerierte 2 ml-Kunststoffröhrchen mit 1 ml Inkubationsmedium zu füllen.

In jedes Inkubationsgefäß wurden mit der Mikropipette 5 Inseln übertragen, anschließend die Inkubationsgefäße mit durchbohrten Kunststoffstopfen verschlossen und bei 37° C im Wasserbad unter leichtem Schütteln bei fortlaufender Carbogenbegasung über einen Zeitraum von 90 Minuten inkubiert (Abb. 4). Um einen Ver-

lust von Inkubat durch Verdunstung zu vermeiden, mußte ein möglichst niedriger Carbogenflow eingehalten werden.

Am Ende der Hauptinkubation wurden in rascher Reihenfolge je 0,5 ml Medium aus den Ansätzen abpipettiert und bis zur Insulinbestimmung bei -20° C aufbewahrt. Da es prinzipiell vorkommen kann, daß beim Umpipettieren nicht immer 5 Inseln in die Inkubationsgefäße gelangen, wurde der Versuch mit einer mikroskopischen Kontrolle der Ansätze abgeschlossen.

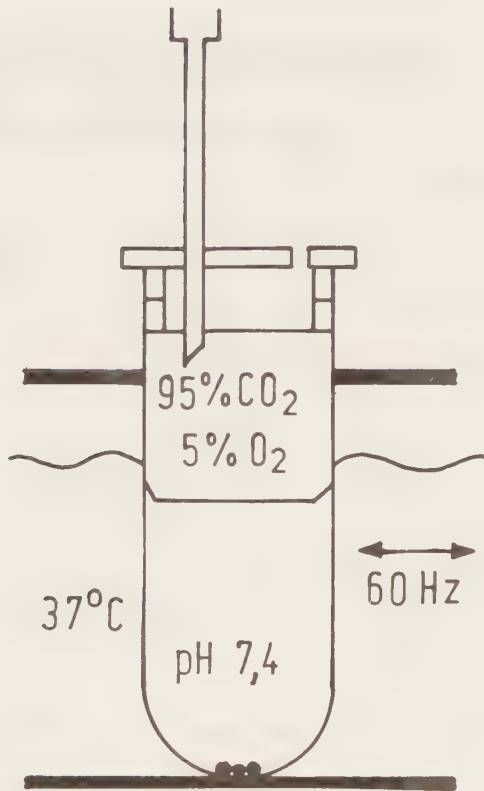


Abb. 4: Schematische Darstellung der Inkubationsbedingungen

3.3. Insulinbestimmung

Die Insulinkonzentrationen wurden radioimmunologisch nach dem Prinzip der Isotopenverdünnung bestimmt (28, 33, 67). Als Standard diente Ratteninsulin. Die Eichkurve umfaßte den Bereich 0 - 200 $\mu\text{U/ml}$; bei gemessenen Konzentrationen von über 150 $\mu\text{U/ml}$ wurde die Bestimmung in einer Verdünnung von 1 : 1 wiederholt. In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium wurden folgende Verdünnungen gewählt:

Glucose 0:	Keine Verdünnung
Glucose 100:	1 : 1
Glucose 300:	1 : 14

Alle Messungen der Insulinkonzentration erfolgten als Doppelbestimmungen.

3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Um die zelluläre Integrität der Langerhans'schen B-Zellen nach der Isolation und der Vorinkubation beurteilen zu können, wurden die isolierten Inseln

nach 30 - 60 minütiger Fixation mit Glutaraldehyd
(2,5 %) in einer nach SOERENSEN gepufferten
Saccharoselösung aufbewahrt. Der manuellen Einbet-
tung in Epon folgte die Anfertigung von Ultradünn-
schnitten und deren Kontrastierung mit Uranylacetat.

4. VERSUCHE

Die Wirkung der Harnsäure auf die Insulinsekretion der B-Zellen wurde in Versuchsserien mit glucose-freiem Medium sowie unter basalen Bedingungen mit 100 mg/dl Glucose und unter Stimulation mit 300 mg/dl Glucose im Medium untersucht (59). In diesen 3 Serien wurden in jedem Versuch 3 Gruppen von Ansätzen gebildet, in denen der harnsäurefreien Kontrollgruppe Ansätze mit 3 mg/dl und 6 mg/dl Harnsäure gegenübergestellt wurden.

Somit ergaben sich folgende Versuchsserien:

	Glucosekon- zentration	Harnsäurekon- zentration
Serie 1	0 mg/dl	0 - 3 - 6 mg/dl
Serie 2	100 mg/dl	0 - 3 - 6 mg/dl
Serie 3	300 mg/dl	0 - 3 - 6 mg/dl

5. ERGEBNISSE

5.1. Elektronenmikroskopische Kontrollen

Mit der beschriebenen Methode war es möglich, regelmäßig 200 - 250 funktionsfähige Inseln aus einem Rattenpankreas zu isolieren. Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß die B-Zellen durch den Vorgang der Isolation in ihrer Ultrastruktur nicht geschädigt wurden (Abb. 5, 6). Hierfür sprach auch das quantitative Ausmaß der unter Glucosestimulation freigesetzten Insulinmenge.

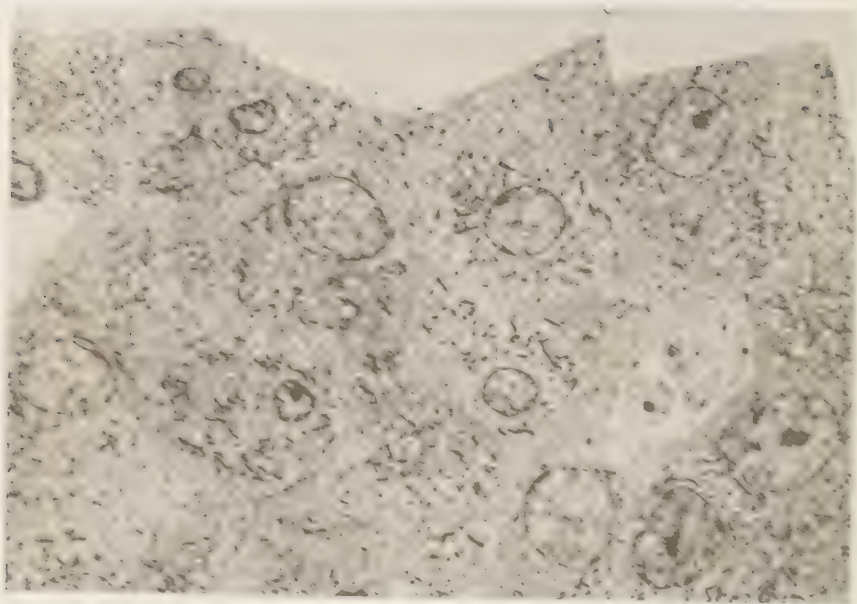


Abb. 5: Ausschnitt aus einer isolierten Langerhans'schen
Insel-(Montage)-Vergrößerung: $\times 3.500$
Peripherie der Insel frei von exokrinem Gewebe

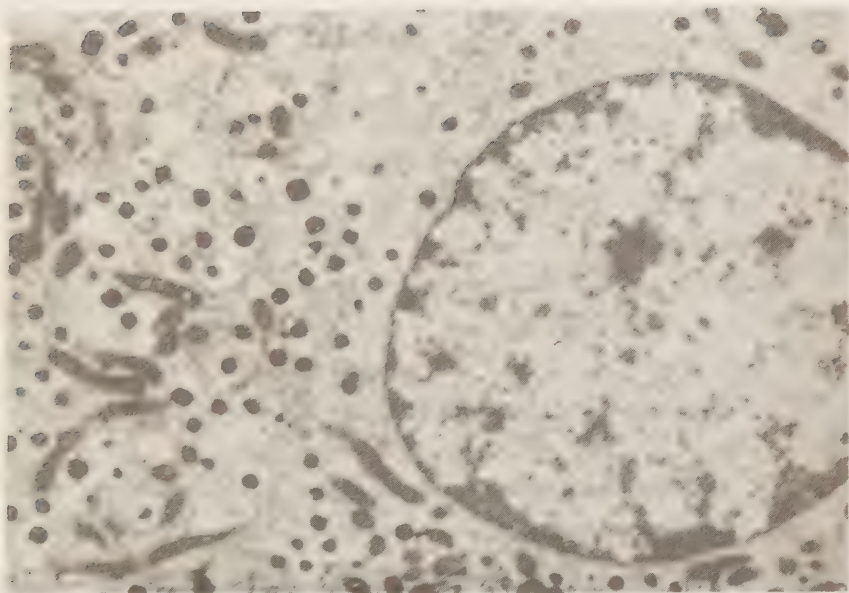


Abb. 6: Ausschnitt aus einer B-Zelle einer isolierten
Langerhans'schen Insel-(Montage)-Vergrößerung:

x 16.400

Sehr gut erhaltene Organellen

5.2. Inkubationsversuche

5.2.1. Serie 1 (glucosefreies Medium)

a) Ohne Zusatz von Harnsäure:

In 48 Versuchsansätzen mit je 5 Inseln/ml wurden nach 90 Minuten Inkubation 80 $\mu\text{U/ml}$ Insulin gefunden (95 % Vertrauensgrenze des Medians ($\tilde{x}$): 67,0 - 108,0 $\mu\text{U/ml}$).

b) Unter Zusatz von 3 mg/dl Harnsäure:

Die ebenfalls in 48 Versuchsansätzen mit 5 Inseln/ml nach 90 Minuten gemessene mittlere Insulinkonzentration ($\bar{x}$) lag bei 103 $\mu\text{U/ml}$ (95 % Vertrauensbereich: 88,5 - 118,4 $\mu\text{U/ml}$).

c) Unter Zusatz von 6 mg/dl Harnsäure:

Die in 47 Versuchsansätzen bestimmte mittlere Insulinkonzentration ($\bar{x}$) betrug für 5 Inseln/ml 90 Minuten 102 $\mu\text{U/ml}$ (95 % Vertrauensbereich: 87,4 - 116,5 $\mu\text{U/ml}$).

5.2.2. Serie 2 (100 mg/dl Glucose im Medium)

a) Ohne Zusatz von Harnsäure:

Der Median ($\tilde{x}$) der in 102 Versuchsansätzen bestimmten Insulinkonzentration betrug 125 $\mu\text{U/ml}$ bei 5 Inseln/ml/90 Minuten (95 % Vertrauensbereich: 100,0 - 147,0 $\mu\text{U/ml}$).

b) Unter Zusatz von 3 mg/dl Harnsäure:

In 104 Versuchsansätzen betrug der Median ($\tilde{x}$) der von 5 Inseln/ml/90 Minuten sezernierten Insulinmenge 172 $\mu\text{U/ml}$ (95 % Vertrauensbereich: 140,0 - 198,0 $\mu\text{U/ml}$).

c) Unter Zusatz von 6 mg/dl Harnsäure:

In 94 Versuchsansätzen lag der Median ($\tilde{x}$) der Insulinkonzentration bei 141 $\mu\text{U/ml}$ für 5 Inseln/ml/90 Minuten (95 % Vertrauensbereich: 120 - 180 $\mu\text{U/ml}$).

5.2.3. Serie 3 (300 mg/dl Glucose im Medium)

a) Ohne Zusatz von Harnsäure:

Die in 78 Versuchsansätzen mit 5 Inseln/ml/90 Min. gemessene mittlere Insulinkonzentration ($\bar{x}$) lag bei 1.472,0 $\mu\text{U/ml}$ (95 % Vertrauensbereich: 1.363,3 - 1.581,0 $\mu\text{U/ml}$).

b) Unter Zusatz von 3 mg/dl Harnsäure:

Der Median ($\tilde{x}$) der in 76 Versuchsansätzen bestimmten Insulinmenge lag bei 1.675,0 $\mu\text{U/ml}$ für 5 Inseln/ml/90 Minuten (95 % Vertrauensbereich: 1.600,0 - 1.740,0 $\mu\text{U/ml}$).

c) Unter Zusatz von 6 mg/dl Harnsäure:

In 75 Versuchsansätzen betrug der Median ($\tilde{x}$) der von 5 Inseln/ml/90 Minuten sezernierten Insulinmenge 1.835 $\mu\text{U/ml}$ (95 % Vertrauensbereich: 1.655,0 - 1.975,0 $\mu\text{U/ml}$).

5.3. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Die im glucosefreien Medium ohne und mit Zusatz von 3 und 6 mg/dl Harnsäure gemessenen Insulinkonzentrationen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei einer basalen Glucosekonzentration von 100 mg/dl nach Zusatz von 3 und 6 mg/dl Harnsäure eine signifikant höhere Insulinkonzentration ($p < 0,01$ %) gegenüber dem Ausgangswert ohne Harnsäure. Die beiden Insulinkonzentrationen unter Harnsäurezusatz unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Zunahme der Harnsäurekonzentration von 3 auf 6 mg/dl im Inkubationsmedium zu keiner weiteren Steigerung der Insulinfreisetzung bei basaler Stimulation führt.

Bei einer stimulierenden Glucosekonzentration von 300 mg/dl im Medium kam es unter Zugabe von 3 mg/dl Harnsäure zu einem signifikanten Anstieg der Insulinsekretion gegenüber dem Vergleichswert ohne Harnsäure. Dies gilt auch für die Versuchsserie unter Zusatz von 6 mg/dl Harnsäure.

Dosis-Wirkungsunterschiede zwischen den Versuchen mit den beiden Harnsäurekonzentrationen ergaben sich nicht.

Tabellarische Zusammenfassung der statistischen Auswertung:

Harnsäure	0/3	0/6	3/6
Glucosekonzentration:			
0 mg/dl	n.s.	n.s.	n.s.
100 mg/dl	$p < 0,01 \%$	$p < 0,01 \%$	n.s.
300 mg/dl	$p < 0,01 \%$	$p < 0,01 \%$	n.s.

6. DISKUSSION

6.1. Methoden

6.1.1. Isolationsmethode

Untersuchungen zur Insulinsekretion der B-Zellen sind vor allem dadurch erschwert worden, daß die Inseln bei Säugetieren diffus im Pankreas verteilt sind. Die Methoden der Isolation von Langerhans'schen Inseln (30, 36), insbesondere die auf Versuchen von MOSKALEWSKI (35) aufbauende Collagenasemethode, haben dieses Problem weitgehend gelöst und dem Studium der Insulinsekretion neue Impulse gegeben. Die heute in zahlreichen Modifikationen am häufigsten eingesetzte Methode nach LACY und KOSTIANOWSKI (36) ist einfach und ermöglicht gut reproduzierbare Ergebnisse. Einige Aspekte, die für das Gelingen der Versuche von entscheidender Bedeutung sind, sollen erläutert werden.

Die Bedeutung einer intensiven mechanischen Zerstörung des Gewebeverbandes zeigte sich in Vorversuchen, bei denen das Pankreas ohne vorausgehende Pufferinjektion

probeweise nach der Originalmethode von MOSKALEWSKI (55) allein mit der Schere zerkleinert wurde. Hierbei ergaben sich trotz einer sehr hohen Enzymkonzentration von 1.450 U/ml nur geringe Ausbeuten von 20 - 50 Inseln pro Pankreas. Durch intensives Aufblähen des Pankreas mit Puffer konnte eine Dehnung des Bindegewebsgerüsts erreicht werden, ohne daß die Langerhans'schen Inseln, die keine Verbindung zum Gangsystem besitzen, geschädigt wurden (Abb. 7). Durch Anwendung dieser Technik ergaben sich regelmäßig Ausbeuten von mehr als 200 Inseln pro Organ. Darüberhinaus hatte die intensive Homogenisation den Vorteil, daß sich die Collagenasekonzentration auf 360 U/ml reduzieren ließ. Dies ist deshalb von Bedeutung, da verschiedene Beobachtungen darauf hinweisen, daß Collagenase als Peptidase Struktur und Funktion der B-Zellen beeinträchtigen kann (27, 58).

Die Dauer der Enzymeinwirkung wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die nicht vollständig standardisierbar sind. Eine Rolle spielen beispielsweise die Enzymkonzentrationen und mechanische Faktoren. Hohe Enzymkonzentrationen erfordern bei gleichem Homogenisationsgrad kürzere Inkubationszeiten, niedrigere En-

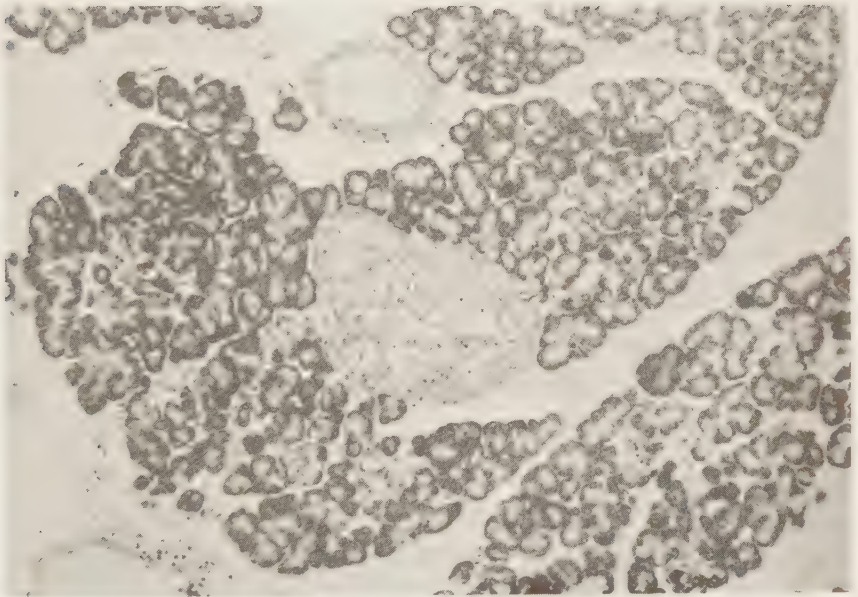


Abb. 7: Schnitt durch Rattenpankreas nach dem Aufblähen

Färbung: van GIESON, Vergrößerung: x 600

zymkonzentrationen entsprechend längere Verdauungszeiten. Unter beiden Voraussetzungen muß das Risiko der B-Zellen-Schädigung sorgfältig abgewogen werden. Daher sollte die Enzymkonzentration möglichst so gewählt werden, daß die Verdauungszeit zur Minderung des Schädigungsgrades in einem optimalen Bereich liegt.

Je intensiver die im Schüttelbad erzeugten Turbulenzen während der Isolation sind, desto kürzer ist die Inkubationszeit. Auch das intensive Aufblähen des Organs führt zu einer Verkürzung der Verdauungszeit, da der Zellverband bereits hierdurch zum Teil mechanisch gelockert wird.

Aufgrund der Erfahrungen aus Vorversuchen wurde auf gleichbleibende Bedingungen, insbesondere auf höchstmögliche Schüttelfrequenz, konstante Enzymkonzentration (360 U/ml) und intensives Homogenisieren geachtet. Alle gelungenen Collagenaseverdauungen wurden unter diesen Bedingungen im Zeitraum von $10 \frac{1}{2} \pm 1$ Minute beendet. Da bei allen ausgewerteten Versuchsserien Ratten gleichen Alters benutzt wurden, konnte dieser Zeitraum auf etwa 1 Minute begrenzt werden.

Durch die gewonnenen Erfahrungen war es dann möglich, für dieses kurze Intervall den optimalen Zeitpunkt des Inkubationsendes festzulegen.

Um eine Schädigung der Langerhans'schen Inseln zu verhindern, mußte das Enzym ausreichend ausgewaschen werden. Durch das oben beschriebene Vorgehen konnte ein Abfall der Enzymkonzentration auf 1 U/ml zu Beginn des Abpipettierens erreicht werden.

Für die Trennung der exokrinen und endokrinen Zellverbände verwendeten bereits LACY und KOSTIANOWSKI (36) zwei Methoden: das Abpipettieren mit einer Schlinge oder mit einer Mikropipette und die Dichtegradientenzentrifugation. Letztere Methode ist zwar eleganter, jedoch ließ sich aufgrund der hohen Osmolarität der Gradientenmaterialien eine Schädigung der Inseln nicht ausschließen. Daher wurde dem arbeitsaufwendigeren Abpipettieren der Vorzug gegeben. Die Verwendung eines Stereomikroskopes garantiert dabei hervorragende Arbeitsbedingungen, da sich die Inseln auch ohne Verwendung von Neutralrot als Vitalfarbstoff vom exokrinen Gewebe durch Farbe, Form und Größe sehr gut unterscheiden lassen. Bei den Versuchen zeigte sich, daß es gün-

stiger ist, beim ersten Isolationsschritt die Gewebemengen pro Schälchen gering zu halten, statt dessen mehrere Schälchen durchzusuchen, da bei diesem Vorgehen weniger exokrines Gewebe mit übertragen wird und dadurch die weiteren Pipettierschritte erleichtert und beschleunigt werden. Mit einiger Übung ließen sich so innerhalb von 30 Minuten nach Beendigung des Auswaschens der Collagenase ca. 200 - 250 von exokrinem Gewebe freie Inseln erhalten (Abb. 8).

6.1.2. Inkubationsmethode

Mit der Vorinkubation wird erreicht, daß sich die Langerhans'schen B-Zellen stabilisieren und vorausgegangene Einflüsse des Isolationsvorganges ausgeglichen werden. Da der Temperaturabfall die Insulinsekretion reversibel hemmt, wurde durch das Auswaschen des Insulins bei der Vorinkubation gleichzeitig eine Synchronisation der B-Zellen erreicht (14).

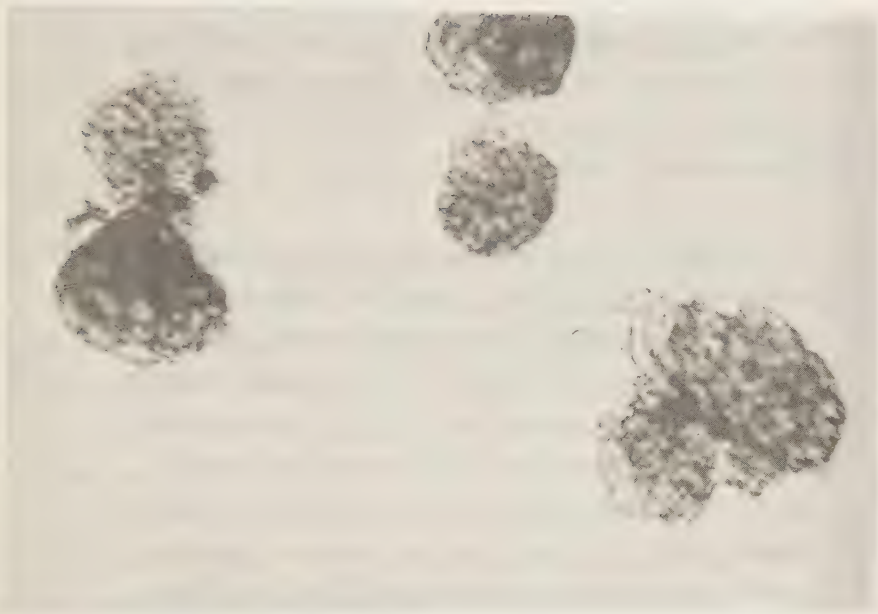


Abb. 8: Isolierte Langerhans'sche Inseln

Vergrößerung: x 600

In keinem Fall konnte bei der Probeentnahme für die Insulinbestimmung beobachtet werden, daß Langerhans'sche Inseln mit den Proben abpipettiert wurden. Wenn bei der Endkontrolle mehr oder weniger als 5 Inseln pro Ansatz gefunden wurden, erfolgte eine Umrechnung der ermittelten Insulinmenge auf eine Inselzahl von 5/Ansatz. Ansätze mit weniger als 4 und mehr als 6 Inseln wurden verworfen.

Das gewählte in-vitro-Modell zum Studium der Insulinsekretion hat den Vorteil, Langerhans'sche Inseln mit geringem Zeitaufwand in ausreichend großer Anzahl und Reinheit gewinnen zu können. Mit der Vielzahl der für den Versuch verfügbaren Proben ist die Voraussetzung gegeben, die Wirkung von Testsubstanzen auf das Verhalten der Insulinsekretion ohne den gleichzeitigen Einfluß modifizierender Faktoren rasch zu überprüfen. Jedoch war es bislang nicht möglich, die Isolationsbedingungen optimal zu standardisieren. Ebenso läßt die Verwendung von Collagenase nicht ausschließen, daß wichtige Strukturen der Zellmembran beschädigt werden und somit die Aussage der Versuchsergebnisse limitiert wird (27, 56, 58). Darüber hinaus ist es nicht möglich, aufgrund des unterschiedlichen Volumens der Langerhans'schen Inseln (26) für jeden ein-

zelnen Inkubationsansatz die gleiche Anzahl von B-Zellen zu erhalten; daher sind für den statistischen Vergleich solcher Untersuchungen ausreichend umfangreiche Stichproben notwendig (10).

6.2. Harnsäure und Insulinsekretion

Über die physiologischen Wirkungen der Harnsäure ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur wenig bekannt. Chemisch ist Harnsäure ein Elektronen-Donor. Untersuchungen von MATSUSHITA (50) haben gezeigt, daß es unter in-vitro-Bedingungen antioxydative Eigenschaften aufweist. Durch Harnsäure konnte GRIFFITHS bei Cystein-mangelernährten Kaninchen passagere Hypoglykaemien erzeugen (21). Diese Ergebnisse konnten jedoch von anderen Arbeitsgruppen (11, 25) nicht bestätigt werden. Interessant ist eine Beobachtung aus den 50-er Jahren von MARTINEZ (48), daß Harnsäure bei Ratten vor Alloxandibetes schützen kann. Von Verhaltensforschern (60) wurde die Vermutung geäußert, daß Harnsäure beim Menschen die Funktion des Vitamin C teilweise übernommen haben könnte. Beweise für diese Annahme liegen bislang nicht vor. An der Bedeutung der Harnsäure als ursächliches Agens der Gicht be-

stehen indessen keine Zweifel. Umso erstaunlicher sind die nur geringen Erkenntnisse über die physiologische und patho-physiologische Rolle dieser Substanz.

Den Ergebnissen der Inkubationsversuche ist zu entnehmen, daß Harnsäure in Gegenwart von Glucose einen Einfluß auf die Insulinsekretion der B-Zelle hat. Die Interpretation dieser Versuchsergebnisse bedarf einiger weniger Kenntnisse des physiologischen Ablaufes der Insulinsekretion.

Es gilt heute als weitgehend gesichert, daß die Abgabe des B-Zellen-Hormons nach Glucosestimulation in zwei Phasen verläuft (13, 15, 23). Die Glucosaemie wird initial mit einer maximal 5 Minuten andauernden peakförmig verlaufenden Insulinfreisetzung beantwortet, die etwa 2 - 3 % des verfügbaren zellulären Hormonvorrates ausmachen soll (24). Gleichzeitig setzt eine langsam ansteigende Insulinsekretion ein, die nach ungefähr 45 Minuten ihr Maximum (24) und nach Abfall der Glucosekonzentration wieder basale Werte erreicht. Diese Sekretionskinetik wird mit der Existenz zweier voneinander unabhängiger zellulärer Insulinkompartimente erklärt (13, 23). Hiernach entspricht der ersten Sekre-

tionsphase ein kleiner, sofort verfügbarer Insulinpool, die zweite Phase der Hormonsekretion der Freisetzung von intrazellulär gespeichertem und neu synthetisiertem Insulin. Trotz eines umfangreichen Detailwissens über diesen Vorgang ist der komplexe Mechanismus der Insulinsekretion letztlich noch nicht eindeutig geklärt.

Eine Vielzahl körpereigener und körperfremder Stoffe kann das Sekretionsverhalten der B-Zelle beeinflussen. Hemmstoffe, zu denen die Hormone Adrenalin (15, 38, 53, 66) und Noradrenalin (66), Mannoheptulose (38, 43), das Monosaccharid D-2-Deoxy-Glucose (18, 57), Diazoxid (31, 66), Barbiturat (51), Diphenylhydantoin (35), Salizylsäure (12, 51), Magnesium-Ionen (46) und Methylenblau (2) zählen, verringern die Insulinfreisetzung. Wirkstoffe mit sekretionsfördernden Eigenschaften lassen sich nach MALAISSE (47) unterteilen in glucosestimulierende Substanzen, die den Sekretionseffekt der Glucose nachahmen, ohne die Antwort auf einen maximalen Glucosereiz zu übertreffen, und in glucosepotenzierende Stoffe, die die maximale Sekretionsantwort auf Glucose zum Teil erheblich verstärken. Zu ersteren zählen z.B. Leucin (44,

52), Arginin (44, 52) und Mannose (53), zu letzteren c-AMP (42, 47), Dibutyryl-c-AMP (42, 46, 47) und die Methylxanthine (45, 46, 47, 64).

Ob Glucose bei der Regulation der Insulinsekretion einen direkten Einfluß auf die Aktivität der B-Zelle hat oder über Mediatoren wirksam wird, ist noch immer nicht eindeutig geklärt (3, 41, 49). Auch über die Bedeutung des c-AMP-Systems, dem aufgrund zahlreicher experimenteller Untersuchungen (3, 7, 16, 22, 34, 47, 62) eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Insulinsekretion zugeschrieben werden muß, sind noch viele Fragen offen. Bemerkenswert ist, daß die Methylxanthine, die die c-AMP-Esterase hemmen (6, 22, 61), in Anwesenheit von Glucose auch in der B-Zelle eine Anreicherung von Cyclo-AMP bewirken (22, 42).

Die von ASHCROFT (4) und BRISSON (7) für Coffein und Theophyllin gewählten Wirkstoffmengen waren um zwei Zehnerpotenzen höher als die in den hier beschriebenen Inkubationsversuchen eingesetzten Harnsäurekonzentrationen. Hierbei zeigte sich, daß Harnsäure bereits in physiologischen Konzentrationen ihre

Wirkung entfaltet. Dem Vergleich der Resultate der Versuchsserie I (Glucose 0 mg/dl), II (100 mg/dl Glucose) und III (300 mg/dl Glucose) ist zu entnehmen, daß die sekretionssteigernde Wirkung der Harnsäure an die Anwesenheit von Glucose gebunden ist.

Da nachgewiesen werden konnte, daß die Insulinfreisetzung bei einer Glucosekonzentration von 300 mg/dl im Medium signifikant durch den Zusatz von Harnsäure gesteigert werden kann, läßt sich Harnsäure wie die Methylxanthine den glucosepotenzierenden Wirkstoffen zuordnen. Anhand der Beobachtung, daß bei der Inkubation unter Glucosestimulation (300 mg/dl) die gemessenen Insulinmengen weit höher als unter der basalen Glucosekonzentration von 100 mg/dl sind, läßt sich belegen, daß Harnsäure nicht wie Alloxan auf die B-Zellen zytotoxisch wirken kann. Die hohen Sekretionsraten in Serie III (Glucose 300 mg/dl) zeigen, daß Harnsäure auch die zweite Phase der Insulinsekretion beeinflussen muß.

Aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft der Harnsäure mit Theophyllin und Coffein ist zu vermuten, daß Harnsäure über den gleichen Mechanismus wie die Methylxanthine die Insulinsekretion steigert. Zur Klärung dieser Annahme sind weitere Untersuchungen notwendig.

Obwohl aus den Untersuchungsergebnissen hervorgeht, daß Harnsäure einen Einfluß auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion der B-Zelle hat, muß es offen bleiben, ob diesen Ergebnissen auch eine Bedeutung für immer wieder diskutierte Zusammenhänge zwischen Hyperurikaemie, Gicht und Diabetes mellitus zukommt (5, 29, 65).

7. ZUSAMMENFASSUNG

Da Harnsäure nicht nur mit den insulinotropen Methylxanthinen sondern auch mit dem B-Zellen-Toxin Alloxan gemeinsame Strukturmerkmale aufweist, sollte untersucht werden, ob Harnsäure einen Einfluß auf die Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln hat.

Die Isolation der Langerhans'schen Inseln erfolgte mit einer modifizierten Collagenasemethode nach LACY und KOSTIANOWSKI.

Für die Sekretionsstudie wurde eine einfache Inkubationsmethode eingesetzt.

Die Wirkung von Harnsäure auf die Insulinsekretion wurde im glucosefreien sowie im glucosehaltigen Medium mit Konzentrationen von 100 mg/dl und 300 mg/dl untersucht. Die Versuche erfolgten ohne und mit Zusatz von Harnsäure in den Konzentrationen von 3 mg/dl und 6 mg/dl.

Im glucosefreien Medium hatte Harnsäure keinen signifikanten Einfluß auf die Insulinsekretion. Im glucosehaltigen Medium kam es hingegen bei Zusatz von Harnsäure (3 mg/dl, 6 mg/dl) zu einem signifikanten Anstieg der Insulinabgabe ins Medium. Eine sichere Dosis-Wirkungs-Beziehung ließ sich für die gewählten Harnsäurekonzentrationen nicht nachweisen.

Die Versuchsergebnisse weisen darauf hin, daß die stimulierende Wirkung der Harnsäure auf die Insulinsekretion mit der von Methylxanthinen vergleichbar ist. Ein dem Alloxan entsprechender zytotoxischer Effekt auf die B-Zellen kann für Harnsäure ausgeschlossen werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. AMMON, H.P.T.; STEINKE, J.:

Effect of 6-Aminonicotinamide in Insulin Release
and C-14 Glucose Oxidation by Isolated Pancreatic
Rat Islets: Difference between Glucose, Tulbotami-
de and Aminophylline
Endocrinology 91 (1972), 33 - 38

2. AMMON, H.P.T.; PATEL, T.N.; STEINKE, J.:

The Role of the Pentose Phosphate Shunt in Gluco-
se-Induced Insulin Release: In-vitro Studies with
6-Aminonicotinamide, Methylene Blue, NAD^+ , NADH ,
 NADP^+ , NADPH and Nicotinamide on Isolated Pancreatic
Rat Islets
Biochem.Biophys.Acta 297 (1973), 352 - 367

3. ASHCROFT, S.J.H.; RANDLE, P.J.:

Glucose Phosphorylation and Glucose Oxidation in
Mouse Pancreatic Islets and the Release of Insulin
In: Falkmer, S., Hellmann, B., Täljedal, J.-B.,
The Structure and Metabolism of the Pancreatic
Islets
Pergamon Press, Oxford (1970), 225 - 231

4. ASHCROFT, S.J.H.; BASSET, J.M.; RANDLE, P.J.:
Isolation of Human Pancreatic Islets Capable
of Releasing Insulin and Metabolising Glucose
in-vitro
The Lancet I (1971), 888 - 889
5. BECKETT, A.G.; LEWIS, J.G.:
Gout and the Serum Uric Acid in Diabetes Mellitus
Quart.J.Med. 29 (1960), 443 - 457
6. BOWEN, V.; LAZARUS, N.R.:
Glucose-Mediated Insulin Release: 3', 5' cAMP
Phosphodiesterase
Diabetes 22 (1973), 738 - 743
7. BRISSON, G.R.; MALAISSE-LAGAE, F.; MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-
Induced Insulin Release.
VII. A Proposed Site of Action for Adenosine-3',
5'-Cyclic Monophosphate
J.Clin.Invest. 51 (1972), 232 - 241

8. BUCHANAN, K.D.; VANCE, J.E.; WILLIAMS, R.H.:
Effect of Starvation on Insulin and Glucagon
Release from Isolated Islets of Langerhans
of the Rat
Metabolism 18 (1969), 155 - 162
9. BURR, I.M.; KANAZAWA, Y.; MARLISS, E.B.;
LAMBERT, A.E.:
Biphasic Insulin Release from Perifused
Cultured Fetal Rat Pancreas-Effects of
Glucose, Pyruvate and Theophylline
Diabetes 20 (1971), 592 - 597
10. CAMPELL, R.C.:
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1971
11. COLLIN-WILLIAMS, J.; BAILEY, C.C.:
Effect of Uric Acid in Glutathione-Deficient
Rabbits
P.S.E.B.M., 71 (1949) 583 - 587

12. COORE, H.G.; RANDLE, P.J.:

Regulation of Insulin Secretion Studied
with Pieces of Rabbit Pancreas Incubated
in-vitro

Biochem. J. 93 (1964), 66 - 78

13. CURRY, D.L.; BENNETT, L.L.; GRODSKY, G.M.:

Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused
Rat Pancreas

Endocrinology 83 (1968), 572 - 584

14. CURRY, D.L.; CURRY, K.P.:

Hypothermia and Insulin Secretion

Endocrinology 87 (1970), 750 - 755

15. CURRY, D.L.:

Factors Affecting Insulin Secretion in-vitro

Am.J.Clin.Nutr. 23 (1970), 305 - 310

16. DAVIS, B.; LAZARUS, N.R.:

Insulin Release from Mouse Islets

Effect of Glucose and Hormones on Adenylat
Cyclase

Biochem.J. 129 (1972), 373 - 379

17. DUNN, J.S.; SHEEHAN, H.L.; McLEITCHIE, N.G.B.:
Necrosis of Islets of Langerhans Produced
Experimentally
Lancet I (1943) 484 - 487
18. GAGLIARDINO, J.J.; MARTIN, J.M.:
Studies on the Mechanism of Insulin Release
Metabolism 15 (1966), 1.068 - 1.075
19. GERNER, R.; L'AGE-STEHR, J.; TJIOE, T.O.;
WACKER, A.:
Zur Isolierung Langerhans'scher Inseln aus
Rattenpankreas
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351 (1970),
309 - 312
20. GREY, N.J.; GOLDRING, S.; KIPNIS, D.M.:
The Effect of Fasting, Diet and Actinomycin D
on Insulin Secretion in the rat
J.Clin.Invest. 49 (1970), 881 - 889

21. GRIFFITHS, M.:
The Mechanism of the Diabetogenic Action
of Uric Acid
J.Biol.Chem. 184 (1950), 289 - 298
22. GRILL, V.; CERASI, E.:
Stimulation by D-Glucose of Cyclic Adenosine
3' - 5' Monophosphate Accumulation and Insulin
Release in Isolated Pancreatic Islets of the Rat
J.Biol.Chem. 249 (1974) 4.196 - 4.201
23. GRODSKY, G.; LANDAHL, H.; CURRY, D.; BENNETT, L.:
In-Vitro Studies Suggesting a Two-Compartmental
Model for Insulin Secretion
In: Falkmer, S.; Hellman, B.; Täljedal, I.-B.
The Structure and Metabolism of the Pancreatic
Islets
Pergamon Press, Oxford (1970), 409 - 421
24. GRODSKY, G.M.; FANSKA, R.; SCHMIDT, F.G.:
Evaluation of the Role of Exogenous Insulin
on Phasic Insulin Secretion
Diabetes 22 (1973), 256 - 263

25. GRUNERT, G.G.; PHILLIPS, P.H.:
Uric Acid Diabetes in the Rat
P.S.E.B.M. 76 (1951), 642 - 645
26. HAHN, H.J.; MICHAEL, R.; KANSY, H.:
Untersuchungen an Langerhans'schen Inseln
in vitro.
VI. Der Einfluß der Inselgröße auf die
Insulinsekretion
Acta biol.med.germ. 25 (1970), 939 - 943
27. HAHN, H.J.; ZIEGLER, M.; JAHR, H.; BUTTER, R.;
KOHNET, K.D.:
Investigations on Isolated Islets of Langerhans
in-vitro
XII. Experiments Concerning the Preparation
Conditions with Collagenase
Endokrinologie 67 (1976), 67 - 78
28. HALES, C.N.; RANDLE, P.J.:
Immunoassay of Insulin with Insulin-Antibody
Precipitate
Biochem.J. 88 (1963), 137 - 146

29. HASSLACHER, Ch.; WAHL, P.; VOLLMAR, J.:

Diabetes und Hyperurikämie

Dtsch.med.Wschr. 99 (1974), 2.506 - 2.510

30. HELLERSTRÖM, C.:

A Method for the Microdissection of Intact
Pancreatic Islets of Mammals

Acta Endocrinologica 45 (1964), 122 - 132

31. HOWELL, S.L.; TAYLOR, K.W.:

Effects of Diazoxide on Insulin Secretion
in-vitro

Lancet I (1966), 128 - 129

32. HOWELL, S.L.; TAYLOR, K.W.:

Potassium Ions and the Secretion of Insulin
by Islets of Langerhans Incubated in-vitro

Biochem.J. 108 (1968), 17 - 24

33. Isotopen Dienst West GmbH

Radioimmunologische Bestimmung von Insulin -
Arbeitsanleitung für den CIS-Reagenziensatz
Insik-3 (1977)

34. JARROUSSE, Cl.; ROSSELIN, G.:

Interaction of Amino Acids and Cyclic AMP on
the Release of Insulin and Glucagon bei New-
born Rat Pancreas

Endocrinology 96 (1975), 168 - 177

35. KIZER, J.S.; VARGAS-CORDON, M.; BRENDDEL, K.;

BRESSLER, R.:

The In-Vitro Inhibition of Insulin Secretion
by Diphenylhydantoin

J.Clin. Invest. 49 (1970) 1.942 - 1.948

36. LACY, P.E.; KOSTIANOWSKI, M.:

Method for the Isolation of Intact Islets
of Langerhans from the Rat Pancreas

Diabetes 16 (1967), 35 - 39

37. LAMBERT, A.E.; JEANRENAUD, B.; RENOLD, A.E.:

Enhancement by Coffeine of Glucagon-Induced
and Tolbutamide-Induced Insulin Release from
Isolated Foetal Pancreatic Tissue

Lancet I (1967), 819 - 820

38. LERNMARK, A.; HELLMANN, B.:

Effect of Epinephrine and Mannoheptulose on
Early and Late Phases of Glucose-stimulated
Insulin Release

Metabolism 19 (1970), 614 - 618

39. LEVY, J.; HERCHUELZ, A.; SENER, A.; MALAISSE, W.J.:

The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-
Induced Insulin Release

XX. Fasting: A Model for Altered Glucose
Recognition by the B-Cell

Metabolism 25 (1976), 583 - 591

40. LIN, B.J.; HAIST, R.E.:

Effects of Some Modifiers of Insulin Secretion
on Insulin Biosynthesis

Endocrinology 92 (1973), 735 - 742

41. LIN, B.J.; HAIST, R.E.:

Insulin Biosynthesis: The Monoaminergic

Mechanism and the Specificity of "Glucoreceptor"

Endocrinology 96 (1975), 1.247 - 1.253

42. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.; MAYHEW, D.:
A Possible Role for the Adenylatcyclase
System in Insulin Secretion
J.Clin.Invest. 46 (1967) 1.724 - 1.734
43. MALAISSE, W.J.; LEA, M.A.; MALAISSE-LAGAE, F.:
The Effect of Mannoheptulose on the Phosphory-
lation of Glucose and the Secretion of Insulin
by Islets of Langerhans
Metabolism 17 (1968), 126 - 132
44. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.:
Stimulation of Insulin Secretion by Noncarbohy-
drate Metabolites
J.Lab.Clin.Med. 72 (1968), 438 - 448
45. MALAISSE, W.J.; MALAISSE-LAGAE, F.:
Biochemical, Pharmacological and Physiological
Aspects of the Adenylatcyclase - Phosphodiester-
ase System in the Pancretic B-Cells
In: Falkmer S., Hellmann, B, Täljedal, I.-B.;
The Structure and Metabolism of the Pancretic
Islets
Pergamon Press, Oxford (1970), 435 - 444

46. MALAISSE, W.J.; BRISSON, G.; MALAISSE-LAGAE, F.:

The Stimulus Secretion Coupling of Glucose-
Induced Insulin Release

I. Interaction of Epinephrine and Alkaline
Earth Cations

J.Lab.Clin.Med. 76 (1970), 895 - 902

47. MALAISSE, W.J.:

Insulin Secretion: Multifactorial Regulation
for a Single Process of Release

Diabetologia 9 (1973), 167 - 173

48. MARTINEZ, C.:

Influencia de algunos compuestos puricos y
pirimidicos sobre la diabetes aloxanica

Rev.Soc.Argent, Biol. 26 (1950), 89 - 98

49. MATSCHINSKY, F.M.; ELLERMAN, J.E.; KRZANOWSKI, J.;

KOTLER-BRAJTBURG, J.; LANDGRAF, R.; FERTEL, R.:

The Dual Function of Glucose in Islets of
Langerhans

J.Biol.Chem. 246 (1971), 1.007 - 1.011

50. MATSUSHITA, S.; IBUKI, F.; AOKI, A.:

Chemical Reactivity of the Nucleic Acid
Bases.

I. Antioxidative Ability of the Nucleic
Acids and Their Related Substances on the
Oxidation of Unsaturated Fatty Acids
Arch.Biochem.Biophys. 102 (1963), 446 - 451

51. MENNEAR, J.H.; SCHONWALDER, C.; YAU, E.T.:

The Comparative Effects of Barbituric Acid
and Phenobarbital on Blood Glucose and In-
sulin Secretion in Mice
Diabetologia 12 (1976), 263 - 267

52. MILNER, R.D.G.:

The Mechanism by which Leucine and Arginine
Stimulate Insulin Release in-Vitro
Biochem. Biophys. Acta 192 (1969), 154 - 156

53. MONTAGUE, W.; TAYLOR, K.W.:

Pentitols and Insulin Release by Isolated Rat
Islets of Langerhans
Biochem. J. 109 (1968), 333 - 339

54. MONTAGUE, W.; COOK, J.R.:

The Role of Adenosine 3' : 5' Cyclic Mono-
phosphate in the Regulation of Insulin
Release by Isolated Rat Islets of Langerhans
Biochem. J. 122 (1971), 115 - 120

55. MOSKALEWSKI, S.:

Isolation and Culture of the Islets of Langerhans
of the Guinea Pig
Gen.Comp.Endocrinology 5 (1965), 342 - 353

56. MOSKALEWSKI, S.; SOCHONSKA, K.R.; WIWATOWSKI, T.:

The Presence of a Factor Toxic to Pancreatic
Beta-Cells in Some Collagenase Preparations
Bull. Acad. Polon. Scienc. XXII (1974),
127 - 130

57. NIKI, A.; NIKI, H.; MITA, I.; LIN, B.J.:

Interaction of Alloxan and Anomers of D-Glucose
on Glucose-Induced Insulin Secretion and Bio-
synthesis in-Vitro
Diabetes 25 (1976) 574 - 579

58. NORFLEET, W.T.; PAGLIARA, A.S.; HAYMOND, M.W.;
MATSCHINSKY, F.:
Comparison of Alpha- and Beta-Cell Secretory
Responses in Islets Isolated with Collagenase
and in the Isolated Perfused Pancreas of Rats
Diabetes 24 (1975), 961 - 970
59. PIPELEERS, D.G.; MARICHAL, M.; MALAISSE, W.J.:
The Stimulus-Secretion Coupling of Glucose-
Induced Insulin Release. XIV. Glucose Regulation
of Insular Biosynthetic Activity
Endocrinology 93 (1973), 1.001 - 1.011
60. PROCTOR, P.:
Similar Functions of Uric Acid and Ascorbate
in Man?
Nature 228 (1970), 868
61. RITCHIE, J.M.:
The Xanthines
In: Goodman, J., The Pharmacological Basis of
Therapeutics
4 Ed. McMillan Comp. (1970), 363 - 365

62. SAMS, D.J.; MONTAGUE, W.:

The Role of Adenosine 3' - 5'-Cyclic Monophosphate in the Regulation of Insulin Release
Biochem. J. 129 (1972), 945 - 952

63. TOMITA, T.; LACY, P.E.; MATSCHINSKY, R.M.;

McDANIEL, M.L.:

Effect of Alloxan on Insulin Secretion in Isolated Rat Islets Perifused in-Vitro
Diabetes 23 (1974), 517 - 524

64. TURTLE, J.R.; LITTLETON, G.K.; KIPNIS, D.M.:

Stimulation of Insulin Secretion by Thyephylline
Nature 213 (1967), 727 - 728

65. WHITEHOUSE, F.W.; CLEARY, W.J.:

Diabetes Mellitus in Patients with Gout
JAMA 197 (1966), 113 - 116

66. WONG, K.K.; SYMCHOWICZ, S.; STAUB, M.S.;

TABACHNICK, I.I.A.:

The in-Vitro Effect of Catecholamines, Diazoxide and Theophylline on Insulin Release
Life Sciences 6 (1967), 2.285 - 2.291

67. YALOW, R.S.; BERSON, S.A.:

Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in
Man

J.Clin.Invest. 39 (1960), 1.157 - 1.175

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr.med. W. Grabner ganz besonders für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referates und die Unterstützung bei meiner Arbeit danken.

Herrn Professor Dr.med.L.Demling sage ich meinen besonderen Dank für die Übernahme des Korreferates.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Dr.med. Dr.med.h.c.J.W.Rohen und den Mitarbeitern des anatomischen Instituts der Universität Erlangen-Nürnberg für die Anfertigung und Beurteilung der histologischen Präparate und der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Dipl.-Phys. R.Neuwirth danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich bei Frau E.Dörk vom Endokrinologischen Labor der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen für ihre ausgezeichnete technische Hilfe.

Lebenslauf

Am 20.07.1953 wurde ich als Sohn des Obering. Wilhelm Schuierer und seiner Ehefrau Hildegard Schuierer, geb. Dorn, in Fürth/Bay. geboren. Nach dem Besuch der Volksschule (1959 - 1963) trat ich in das Heinrich-Schliemann-Gymnasium in Fürth/Bay. ein, das ich 1972 mit dem Abitur des humanistischen Zweiges verließ. Im Wintersemester 1972 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg und schloß es im November 1978 ab. Die Approbation erhielt ich am 05.12.1978. In der Folgezeit bis zur Einberufung zum Grundwehrdienst, den ich von Juni 1979 bis August 1980 ableistete, beendete ich die Arbeit an meiner während des Studiums begonnenen Dissertation.

Seit September 1980 arbeite ich als Assistenzarzt im Radiologischen Zentrum - Abteilung Diagnostik - des Städtischen Klinikums Nürnberg.

